



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**DETERMINAÇÃO DO TEOR DE NICOTINA EM CIGARROS
COMERCIAIS E ILEGALMENTE COMERCIALIZADOS UTILIZANDO
MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA E CROMATOGRAFIA
GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

RAFAELLA TRILHA

Florianópolis
Novembro/2009

RAFAELLA TRILHA

**DETERMINAÇÃO DO TEOR DE NICOTINA EM CIGARROS
COMERCIAIS E ILEGALMENTE COMERCIALIZADOS UTILIZANDO
MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA E CROMATOGRAFIA
GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

Relatório apresentado ao Departamento de Química
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial da disciplina de
Estágio Supervisionado II (QMC 5512)

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha

Co-orientador: Doutorando Edmar Martendal

Florianópolis
Novembro/2009

RAFAELLA TRILHA

**DETERMINAÇÃO DO TEOR DE NICOTINA EM CIGARROS
COMERCIAIS E ILEGALMENTE COMERCIALIZADOS UTILIZANDO
MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA E CROMATOGRAFIA
GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

Prof.^a. Dr.^a. Inês Maria Costa Brighente
Coordenadora de Estágios do Curso de Química - Bacharelado

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha
Orientador

Prof. Dr. Luiz Augusto dos Santos Madureira

Dr.^a. Alessandra da Silva Furtado

Florianópolis
Novembro/2009

"Só sabemos com exatidão quando sabemos pouco; à medida que vamos adquirindo conhecimentos, instala-se a dúvida."

Johan Wolfgang Von Goethe

Agradecimentos

Aos meus pais Washington e Elizete por me ensinarem princípios, educação e determinação para alcançar meus objetivos, mas principalmente pelo apoio dado na etapa final do curso.

Ao meu irmão Lucas, pelo carinho e companheirismo.

A Japa, que tive a honra de conhecer no início da graduação. Sempre esteve presente sendo nas horas em que mais precisei ou nas horas alegres. É uma pessoa com um coração enorme, ao qual eu tenho muito carinho e admiração. Obrigada por ser essa amiga tão especial e por tudo que você já fez por mim, não tenho nem palavras para expressar o quanto sou grata por tudo. Você sempre será uma pessoa muito especial na minha vida, e esteja onde eu estiver você sempre terá uma amiga pra lhe ajudar em tudo o que precisar.

Ao meu amigo Marcel. Que foi desde que nos conhecemos, muito importante na minha vida. Tive o privilégio de conhecer essa pessoa maravilhosa, inteligente, admirável, companheira pra todas as horas. Nos momentos mais difíceis que enfrentei, estava sempre ao meu lado, me dando forças pra continuar insistindo no meu sonho, me fazendo acreditar que posso fazer tudo que desejar. Se cheguei até esta etapa hoje, com certeza você foi uma peça fundamental para isto se tornar realidade. Obrigada por ser esse grande amigo, praticamente um irmão, essa pessoa maravilhosa que com certeza vou levar sempre dentro do meu coração. Desejo que você seja muito feliz e nunca se esqueça, mesmo quando tomarmos caminhos opostos, que têm alguém que te admira, te respeita e que vai ser sua amiga para tudo.

Ao Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha, pela oportunidade e por acreditar na idealização deste trabalho, que contribuiu para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao doutorando Edmar Martendal, que me acompanhou e me ajudou em todas as etapas deste trabalho. Obrigada por transmitir seu conhecimento e pela oportunidade de aprendizado que adquiri com suas orientações.

Sumário

Lista de Figuras	iii
Lista de Tabelas	iii
RESUMO	iv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1. Breve histórico	2
2.2. Nicotina	2
2.3. Fabricação de cigarros	3
2.4. Nicotina e cigarro	4
2.4.1. Absorção da nicotina pelo organismo	4
2.5. Teor de nicotina em cigarros	4
2.6. Mercado ilegal de cigarros e os riscos para a saúde	5
2.7. Análise teor nicotina	6
2.8. Cromatografia gasosa e espectrometria de massas (GC-MS)	6
2.9. Microextração em fase sólida (SPME)	7
2.9.1. Princípios da técnica e dispositivo de SPME	7
2.9.2. Tipos de revestimentos para fibras de SPME	7
2.9.3. Modos de extração em SPME	8
2.10. Otimização multivariada	9
2.10.1. Metodologia de superfície de resposta	10
2.10.2. Planejamento composto central	10
3. OBJETIVOS	11
3.1. Objetivo Geral	11
3.2. Objetivos específicos	11
4. MATERIAS E MÉTODOS	12
4.1. Instrumentação	12
4.2. Reagentes e amostras	12
4.3. Procedimento experimental	13

4.3.1. Otimização das condições de extração da nicotina por HS-SPME	13
4.3.2. Otimização das condições de extração da nicotina do cigarro.....	13
4.3.3. Validação do método.....	14
4.3.4. Aplicação do método.....	14
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
5.1. Otimização das condições de extração da nicotina por HS-SPME	15
5.2. Otimização das condições de extração da nicotina do cigarro	17
5.3. Validação do método	19
5.3.1. Avaliação da exatidão do método.....	19
5.4. Aplicação do método proposto.....	20
6. CONCLUSÃO	23
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	24

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura da Nicotina.....	2
Figura 2. Máquina utilizada para medir teor nicotina na fumaça.	5
Figura 3. Dispositivo comercial de SPME.	7
Figura 4. Amostragem direta (A) e do Headspace (B).	8
Figura 5. Esquema de análise utilizando SPME – HS.....	9
Figura 6. Planejamento composto central para duas variáveis.	10
Figura 7. Superfície de resposta para otimização da extração da nicotina.	16
Figura 8. Efeito do aumento do volume da fase extratora sobre a quantidade de nicotina extraída.	18
Figura 9. Comprovação da extração nicotina.	18
Figura 10. Comparação da quantidade de nicotina encontrada em amostras de cigarro.	20

Lista de Tabelas

Tabela 1. Principais propriedades físico-químicas da nicotina.	3
Tabela 2. Características e aplicações das fibras de SPME comerciais.	8
Tabela 3. Respostas obtidas para o planejamento composto central.	16
Tabela 4. Figuras de mérito do método para determinação de nicotina.....	19
Tabela 5. Determinação de nicotina em amostras de cigarro.	20

RESUMO

Comercialmente, o tabaco pode ser encontrado no cigarro, estando presente seu principal alcalóide, a nicotina. As indústrias de cigarro informam em sua embalagem o teor de nicotina presente na fumaça do cigarro, através de uma metodologia padronizada pela ISO. O crescente mercado ilegal de cigarros afeta principalmente a saúde os consumidores, pois não obedece aos padrões de nicotina exigidos pela legislação. Estudos quantitativos já foram realizados, porém não constam análises do teor de nicotina no fumo de cigarros comerciais e ilegalmente comercializados. Diante disto, desenvolveu-se neste trabalho análises de nicotina no fumo de cigarros comerciais e ilegalmente comercializados, utilizando a técnica de HS-SPME por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). A extração da nicotina do fumo foi realizada com a fibra PDMS 100 μm . A otimização das condições de extração foi realizada através de um planejamento composto central, avaliando-se a temperatura e tempo de extração. Através de um gráfico de superfície de resposta obteve-se as condições de extração em 50 $^{\circ}\text{C}$ e tempo de extração 25 min. Um estudo foi realizado para avaliar o efeito da solução extratora de Na_2CO_3 na extração da nicotina do cigarro, observando-se que ocorre apenas a diluição desta. A validação do método apresentou valores de faixa linear (0,1 - 0,6 mg L^{-1}), R^2 (0,995), LOD (0,05 mg L^{-1}), LOQ (0,15 mg L^{-1}). Uma curva de adição de padrão foi realizada e não foi observada a interferência significativa de matriz. A exatidão do método foi de 87 %. O teor de nicotina determinado para os cigarros comerciais ficaram na faixa de $(5,18 \pm 0,21 - 7,57 \pm 0,10 \text{ mg g}^{-1})$ e para ilegalmente comercializados foram de $(11,04 \pm 0,08 - 13,74 \pm 0,74 \text{ mg g}^{-1})$. Observou-se que todas as marcas de cigarros ilegalmente comercializados possuem valores mais elevados do teor de nicotina em relação aos cigarros comerciais. Associados a um procedimento simples de preparo e análise, o método proposto utilizando o sistema SPME – GC – MS foi aplicado com sucesso.

Palavras chave: Nicotina, cigarros comerciais e ilegalmente comercializados, SPME-GC-MS.

1. INTRODUÇÃO

Dados e estudos realizados comprovam que as doenças relacionadas ao tabaco são causadoras da morte de milhões de pessoas por todo o mundo. Este contém muitos componentes tóxicos, dentre eles a nicotina, uma substância psicoativa, estimulante do sistema nervoso central, que causa dependência química e psicológica.

A nicotina presente nas folhas de tabaco é encontrada comercialmente na forma de cigarro. As indústrias de cigarro são obrigadas por lei a informar em sua embalagem o teor de nicotina presente na fumaça do cigarro, através de uma metodologia padronizada internacionalmente pela ISO (International Organization Standardization). No entanto, o comércio ilegal deste produto tem sido um problema de ordem global, economicamente, pois não há a arrecadação de impostos, mas principalmente o risco para a saúde que este pode provocar, uma vez que não passa por nenhum processo de fiscalização.

Análises quantitativas de nicotina, utilizando algumas técnicas analíticas, vêm sendo objeto de estudo em diferentes tipos de matrizes. Todavia, na literatura, não se encontram estudos e metodologias realizados no fumo do teor de nicotina e a comparação deste entre cigarros comerciais e os comercializados ilegalmente.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Breve histórico

O berço do qual se disseminou a nicotina conduzida pelo tabaco, foi a América, onde aborígenes americanos fumavam folhas tabaco em seus rituais religiosos. O primeiro contato do mundo civilizado com a nicotina ocorreu no século XVI, com a chegada do tabaco na Europa.^[1] Durante quase três séculos a forma predominante de consumo do tabaco foi em cachimbo, surgindo várias fábricas por toda a Europa. Outra maneira foi a de aspirar rapé, que perdurou por quase 200 anos.^[1]

O cigarro, como é conhecido hoje, começou a ser produzido industrialmente em meados do século XIX. Houve uma explosão por volta de 1880 nos Estados Unidos, com o surgimento de uma máquina que produzia inicialmente duzentas unidades por segundo, sendo substituídas pelas que produziam milhões, tornando-o de mais fácil manuseio e acessível economicamente, mas sua expansão comercial ocorreu após a Primeira Guerra Mundial.^[1, 2]

2.2. Nicotina

O histórico de identificação da nicotina iniciou-se em 1809, quando o cientista Vauquelin estudando o extrato do tabaco isolou um “óleo vegetal”. Em 1828, Posselt e Reimann da Universidade de Heidelberg, isolaram a nicotina do tabaco. Melsens em 1840 determinou a fórmula química da nicotina e em 1890 Pictet e Crepieux realizaram a primeira síntese.^[3] A nicotina é uma amina terciária constituída em uma piridina e um anel pirrolidina (Figura 1).

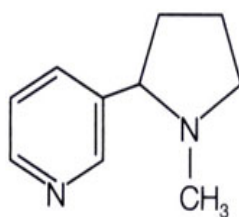


Figura 1. Estrutura da Nicotina

As propriedades físico-químicas da nicotina encontram-se na tabela 1.

Tabela 1. Principais propriedades físico-químicas da nicotina. ^[4]

Nomenclatura	1-metil-2-(3-piridil) pirrolidina
Fórmula molecular	C ₁₀ H ₁₄ N ₂
Massa Molar (g mol⁻¹)	162,23
pK_a	~ 8,0
Ponto de ebulição (°C)	246-247
Estado físico	Líquido amarelo
Solubilidade	Solúvel em água e álcool etílico
Toxicidade (mg kg⁻¹)	LD _{50(oral)} = 50 LD _{50(cutâneo)} =140

Pode ser encontrada em menor quantidade no tomate, berinjela, batata e pimentão, ^[3,5] mas sua fonte principal é a planta ***nicotiana tabacum***. Nas folhas de tabaco, apresenta-se sob duas formas racêmicas, l-nicotina e d-nicotina, onde a primeira constitui 90% do total da planta. É sintetizada nas raízes, subindo pelo caule até as folhas. As maiores concentrações encontram-se nas áreas mais altas da folha e próximas ao talo.^[2]

Em doses elevadas a nicotina ocasiona a redução da pressão arterial, diminuição do tônus muscular, tremores nas mãos, náuseas, vômitos, fraqueza, salivação intensa, cefaléia, diarreia, dificuldade respiratória e taquicardia. ^[6] É uma substância que causa dependência química e psicológica. ^[1]

2.3. Fabricação de cigarros

A fabricação de cigarros inicia-se quando a lâmina (parte tenra da folha) e talos (nervuras da folha de fumo) são desmanchados e separadamente passam por cilindros onde recebem água e vapor, para adquirir maleabilidade. Após este processo, as lâminas de vários tipos de fumo são misturadas, formando o chamado *blend*. Nesta etapa recebem umectantes (glicerol), açúcares (sacarose), aglutinantes (amido) e ameliorantes (extrato de alcaçuz), sendo estas combinações responsáveis pelo sabor específico do cigarro. O *blend* é misturado ao talo e esta mistura recebe agentes de sabor. O resultado desta fase é o chamado fumo desfiado, que irá ser

utilizado nos cigarros. Este fumo é levado através de tubulações para as máquinas de fabricação de cigarros, que produzem até 16 mil unidades por minuto. ^[7]

Após a fabricação são levados até uma máquina que os acondiciona em carteiras, produzindo até 500 por minuto, sendo cada carteira por 20 cigarros envolvidos em papel alumínio, com rótulo e selo. Em seguida recebem uma fina camada de polipropileno, para preservar a característica sensorial e são empacotadas em número de dez carteiras, sendo armazenadas em caixas de papelão contendo 50 pacotes. ^[7]

2.4. Nicotina e cigarro

Comercialmente, o tabaco pode ser encontrado no cigarro, estando presente seu principal alcalóide, a nicotina. A nicotina encontra-se no tabaco sob duas formas, uma ionizada, ligada a sais diversos e outra neutra, como nicotina livre. ^[2]

2.4.1. Absorção da nicotina pelo organismo

A nicotina na forma livre é mais facilmente absorvida pelo organismo. Com a queima do cigarro, o pH do fumo fica em torno de 5,5, fazendo com que uma parte da nicotina livre presente no fumo se ionize e outra parte vá para fase gasosa. Em contato com a mucosa bucal do fumante, uma fração da nicotina livre presente na fumaça ioniza-se, devido ao pH da mucosa bucal ser ácido, não sendo absorvida pela membrana celular. Todavia outra fração chega aos alvéolos pulmonares, que possui pH fisiológico aproximadamente em 7,4, permanecendo desta forma neutra, sendo então absorvida pelas membranas celulares e chegando aos vasos sanguíneos. ^[2]

2.5. Teor de nicotina em cigarros

Com estudos que comprovaram os malefícios da nicotina presentes no cigarro, as indústrias passaram obrigatoriamente a especificar o teor de nicotina em suas embalagens. Para obter o valor dos teores, é usada uma metodologia analítica

padronizada internacionalmente pela ISO (International Organization for Standardization - Norma ISO 3308/2000), onde é medido o teor de nicotina na fumaça em cada cigarro, denominado método do filtro de Cambridge.^[7]

Este método consiste em uma máquina que analisa vinte cigarros simultaneamente, coletando um volume de fumaça de 35 mL, simulando uma tragada de 2 segundos, em intervalos de 60 segundos. A fumaça coletada passa por um filtro que retém a nicotina e o alcatrão. Ao término do processo é realizada a extração da nicotina e do alcatrão do filtro sendo posteriormente analisadas em um cromatógrafo gasoso. A fumaça que passa pelo filtro é coletada em sacos especiais para análise de monóxido de carbono pela técnica de Infravermelho.^[8]



Figura 2. Máquina utilizada para medir teor nicotina na fumaça.

2.6. Mercado ilegal de cigarros e os riscos para a saúde

O mercado ilegal de cigarros é cada vez mais crescente e afeta tanto as indústrias como os consumidores. Uma vez que as indústrias fabricantes de cigarros passam por uma rigorosa inspeção e controle, além dos impostos que lhe são cobradas, os cigarros ilícitos circulam pelo mercado sem inspeção e com um custo mais baixo, consequentemente prejudicando as vendas das indústrias e arrecadação de impostos. O risco do consumo de um cigarro sem fiscalização pode ser muito mais sério para o consumidor, principalmente em relação ao teor de

nicotina, alcatrão e monóxido de carbono, que não obedecem aos padrões exigidos pela legislação. ^[9]

2.7. Análise teor nicotina

Consta na literatura várias técnicas analíticas para análise do teor de nicotina em matrizes como urina, sangue humano e fumaça utilizando: cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), ^[10,11] métodos de extração com solvente seguido de análise espectrométrica ^[12,13], eletroforese capilar (CE) ^[14,15] e a mais abundantemente encontrada, cromatografia gasosa (GC). ^[16, 17,18]

2.8. Cromatografia gasosa e espectrometria de massas (GC-MS)

Cromatografia gasosa (GC) é um método de separação onde os componentes de uma amostra são particionados entre duas fases, sendo uma a fase estacionária (FE) e outra a fase móvel (FM), um gás inerte que percola a coluna cromatográfica. Os componentes da amostra são vaporizados no injetor e carregados pela fase móvel (gás de arraste) através da coluna, sendo separados com base em suas pressões de vapor relativas e afinidade com a fase estacionária. Após a separação, a identificação dos componentes é realizada através de detectores tal como o espectrômetro de massas (MS). ^[19]

No MS, as substâncias gasosas são ionizadas e fragmentadas por uma fonte de ionização. Os íons passam para um analisador no qual são separados pela razão massa/carga (m/z) e chegando ao detector de íons um espectro de massas é gerado pela intensidade do sinal do íon versus sua razão m/z .

No sistema GC-MS, os dados podem ser analisados pela soma da abundância dos íons em cada espectro (modo TIC), ou pela seleção de razões m/z do analito de interesse (Modo SIM). ^[20]

Na implementação de um método cromatográfico, estão associadas etapas de preparo de amostras, visando separar o analito da matriz para uma melhor introdução no CG, pois a maioria destas não pode ser diretamente introduzida no equipamento. Algumas técnicas de preparo podem ser utilizadas: extração líquido-

líquido (LLE), headspace estático (SHS) e dinâmico (DHS), extração em fase sólida (SPE) e microextração em fase sólida (SPME).^[21]

2.9. Microextração em fase sólida (SPME)

A SPME foi introduzida no início da década de noventa pelo professor Janusz Pawliszyn e colaboradores da Universidade de Waterloo, Canadá.^[21] Apresenta muitas vantagens por ser uma técnica simples, rápida e livre da utilização de solventes. É aplicada com eficiência na extração de compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis em diferentes matrizes,^[22] sendo adequada para análises em GC,^[23,24] HPLC^[25] e (CE).^[26]

2.9.1. Princípios da técnica e dispositivo de SPME

O fundamento desta técnica baseia-se na cinética de transferência de massa e na termodinâmica que descreve o equilíbrio de partição do analito, envolvendo sua extração e pré-concentração. A figura 3 apresenta o dispositivo comercial de SPME, que consiste em um bastão de fibra ótica, de sílica fundida, recoberto com um filme fino de um polímero (fibra), que está protegida dentro da agulha do dispositivo.^[27]



Figura 3. Dispositivo comercial de SPME.

2.9.2. Tipos de revestimentos para fibras de SPME

As fibras utilizadas em SPME podem ser revestidas por filmes finos de polímeros, (polidimetilsiloxano = PDMS, poliacrilato = PA), (Carbowax = Cwx), ou por sólidos adsorventes como (carvão ativo = Carboxen).^[27,28] As espessuras destes filmes podem variar de 7 a 100 μm e volumes de 0,03 a 0,7 μL . Algumas aplicações e características para as fibras disponíveis comercialmente para GC encontram-se na Tabela 2.^[27]

Tabela 2. Características e aplicações das fibras de SPME comerciais.

Tipo	Composição química	Aplicação
Não-polares	Polidimetilasiloxano (PDMS)	Compostos apolares, podendo ser utilizadas para polares.
Polares	Poliacrilato (PA) Carbowax/divinilbenzeno álcoois. (CW-DVB)	Média a alta polaridade: fenóis, pesticidas e orgâfosforados. Cetonas, álcoois. Voláteis de média a alta polaridade
Bipolares	PDMS-DVB Carboxen-PDMS	Voláteis e não voláteis de baixa a alta polaridade. Voláteis

Fonte: Adaptado de Valente e colaboradores ^[27]

2.9.3. Modos de extração em SPME

A extração dos analitos pode ser realizada através de amostragem direta, onde a fibra é inserida diretamente dentro da amostra ou amostragem por *headspace* (HS), onde o analito é extraído da fase gasosa acima do líquido, (Figura 4). O modo HS apresenta-se mais vantajoso em relação à amostragem direta, pois prolonga a vida útil da fibra, uma vez que não está em contato direto com a matriz. ^[28]

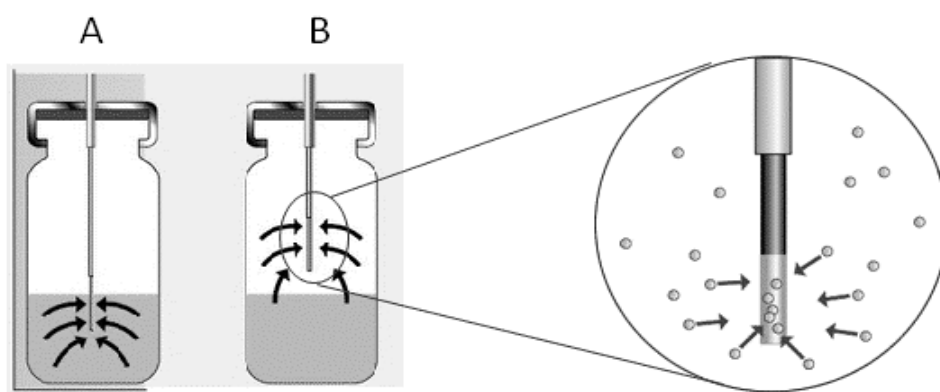


Figura 4. Amostragem direta (A) e do Headspace (B).

O processo de SPME compreende, basicamente, dois passos: a extração (sorção) e a dessorção de analitos. No processo de extração, a fibra entra em contato com a amostra (ou seu *headspace*) e as moléculas do analito se deslocam até a superfície da fibra, penetrando no recobrimento até estabelecer o equilíbrio. Após a extração dos analitos, o dispositivo de SPME é removido e inserido no injetor aquecido do cromatógrafo a gás, ocorrendo a dessorção térmica sob fluxo de gás de arraste, onde os analitos são carregados para a coluna cromatográfica. ^[29] A Figura 5 representa o processo de extração e dessorção por *headspace*.

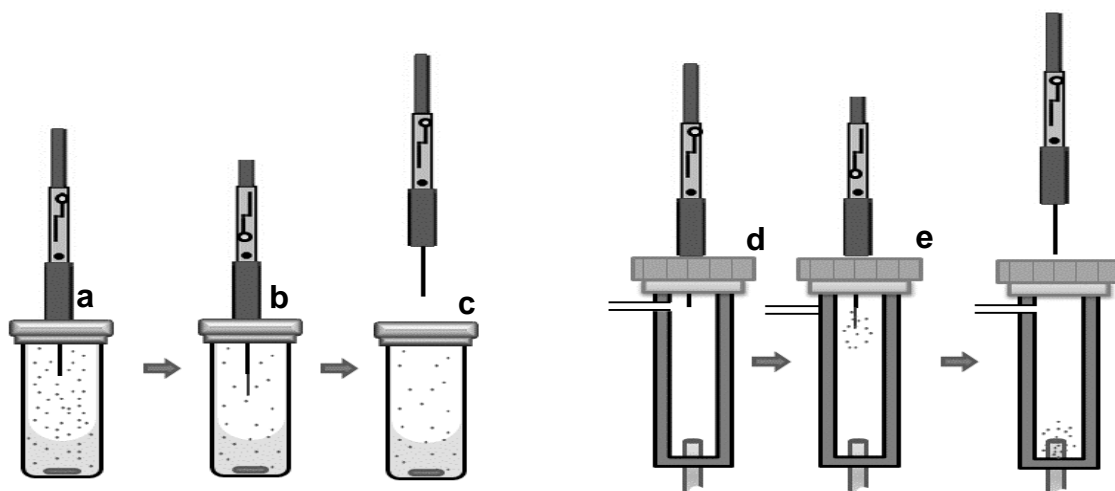


Figura 5. Esquema de análise utilizando SPME – HS.

Legenda: **a** – Inserção do aparato de SPME; **b** – Exposição da fibra (sorção); **c** – Recolhimento da fibra; **d** – Inserção no injetor do GC; **e** – Exposição da fibra (dessorção); **f** – Recolhimento da fibra.

2.10. Otimização multivariada

Com o avanço das técnicas analíticas, houve a necessidade de se obter um tratamento de dados matemático e estatístico mais elaborado, surgindo os tratamentos de dados quimiométricos. Nos últimos anos, os sistemas multivariados de otimização vêm demonstrando a sua utilidade nos mais variados campos do conhecimento, destacando-se os sistemas de planejamento fatorial. Neste sistema, são escolhidas variáveis onde são estudadas as interações destas entre si, com o objetivo de se obter uma melhor resposta analítica. ^[30]

2.10.1. Metodologia de superfície de resposta

Para descrever o sistema estudado visando buscar a melhor condição experimental, a metodologia de superfície de resposta pode ser utilizada. Esta técnica baseia-se na construção de modelos matemáticos empíricos que empregam funções polinomiais lineares ou quadráticas para descrever o sistema estudado.

Nesta metodologia, há a definição dos limites experimentais a serem explorados. O número de experimentos é dado por $2^k + 2k + n$, sendo n o número de experimentos no ponto central e k o número de variáveis. ^[31]

2.10.2. Planejamento composto central

Este planejamento é um dos mais aplicados dentre as metodologias de superfície de resposta. Permite um menor número de experimentos para um menor número de fatores a serem estudados. A construção de um planejamento composto central dá-se pela combinação de uma parte fatorial 2^k , compreendendo as interações dos níveis +1 e -1; uma parte axial, formada por $2k$, com as coordenadas do valor médio, exceto uma que é igual ao valor de α (ou $-\alpha$) e por fim, ensaios realizados no ponto central. A Figura 6 representa a construção de um planejamento composto central envolvendo duas variáveis. ^[31]

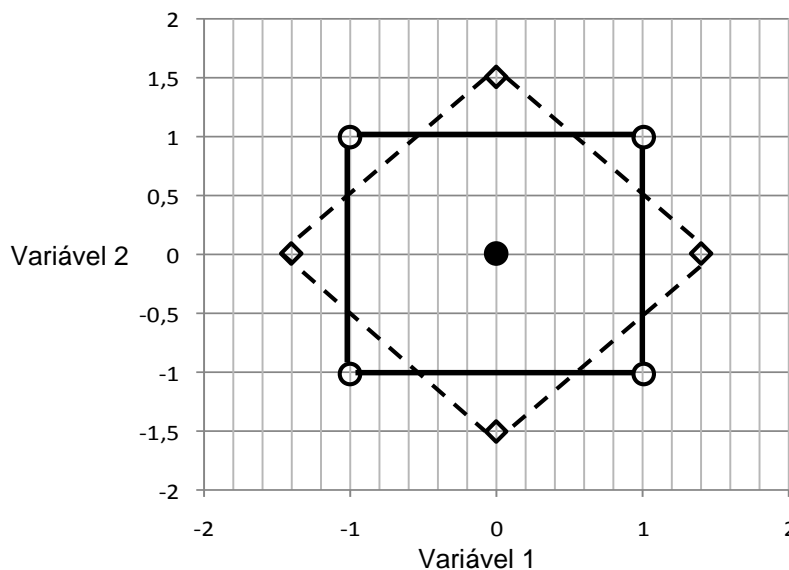


Figura 6. Planejamento composto central para duas variáveis.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Desenvolver um método para análise de nicotina em cigarro utilizando SPME e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

3.2. Objetivos específicos

Otimizar as condições de extração da nicotina de extrato aquoso obtido de amostra de cigarro utilizando a técnica de microextração em fase sólida através de um planejamento composto central para otimização da temperatura e tempo de extração.

Otimizar as condições de extração da nicotina do cigarro através do estudo da relação entre massa de amostra e volume de solução extratora e extrações múltiplas da mesma amostra.

Validar o método proposto avaliando parâmetros de precisão, exatidão, faixa linear, coeficiente de correlação, limites de detecção e quantificação.

Aplicar o método desenvolvido na determinação do teor de nicotina em amostras de cigarros comerciais e ilegalmente comercializados.

4. MATERIAS E MÉTODOS

4.1. Instrumentação

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo a gás Shimadzu GC-QP 2010 Plus (Kyoto, Japão), acoplado com detector de espectrômetro de massas (MS). A separação cromatográfica deu-se em uma coluna capilar RTX- 5MS, 5% difenil e 95% dimetil-polisiloxano, (30 m x 0,25 mm, fase estacionária de 0,25 µm de espessura) obtida da Restek (Benner Circle, Bellefonte, PA, EUA). A programação de temperatura do forno da coluna foi de 50°C (1min), 20 °C min⁻¹ até 100 °C, 10 °C min⁻¹ até 180 °C. As temperaturas do injetor e do detector foram fixadas em 280 °C e 200 °C respectivamente, e a temperatura de interface em 200 °C. Como gás carreador foi utilizado hélio (White Martins, São Paulo, SP, Brasil), na vazão de 1 mL min⁻¹. Todas as injeções foram feitas sem divisão de fluxo (*splitless*). A fibra utilizada em todo o trabalho (PDMS, 100 µm de espessura de recobrimento) foi obtida da Supelco (Bellefonte, PA, EUA).

A agitação das amostras foi realizada com o auxílio de um agitador magnético (Speedlab, São Paulo, SP, Brasil) e a temperatura controlada pelo banho termostatzado MQ- BTC (Microquímica, Florianópolis, SC, Brasil).

4.2. Reagentes e amostras

Todas as soluções utilizadas foram preparadas com água que passou por processo de destilação, seguido de filtração por carvão ativo e desionização. Solução padrão de nicotina com pureza superior a 99% foi obtida da Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, EUA). Uma solução estoque de concentração 200 mg L⁻¹ foi preparada em água e utilizada para a construção da curva de calibração em água e para a curva de calibração por adição de analito. Carbonato de sódio anidro grau PA (Nuclear, Diadema, SP, Brasil) foi utilizado para o preparo da solução extratora e de uma solução saturada em água.

Analizou-se um total de oito amostras de cigarro, sendo quatro diferentes marcas de cigarro comercial e quatro diferentes marcas de cigarro ilegalmente comercializado. As amostras foram adquiridas no comércio local de Florianópolis.

4.3. Procedimento experimental

Em todos os experimentos realizados, as seguintes condições foram fixadas: agitação magnética na velocidade máxima que não desestabilizasse a barra magnética, fibra de PDMS 100 μm , 10 mL de solução aquosa saturada com Na_2CO_3 em frasco de SPME de 40 mL e tempo de pré-equilíbrio de 5 min. O frasco foi então colocado em um banho térmico sob agitação magnética, permanecendo durante cinco minutos para estabilização da temperatura e pré-equilíbrio e a posterior extração da nicotina por SPME a partir do headspace da amostra foi realizada.

4.3.1. Otimização das condições de extração da nicotina por HS-SPME

A otimização da temperatura e tempo de extração da nicotina pela fibra de PDMS foi realizada com amostra de cigarro comercial e ilegalmente comercializado. Para obtenção de um extrato da amostra de cigarro contendo a nicotina, a massa de um cigarro foi adicionada a um balão contendo 30 mL de uma solução aquosa de Na_2CO_3 (pH 11,0). Essa mistura foi agitada por 20min e após esse tempo uma alíquota do extrato obtido foi pipetada e transferida para o frasco de SPME. A temperatura e tempo de extração foram avaliados na faixa de 25 a 65 °C e 0 a 32 min., respectivamente, através de um planejamento composto central. Através dos dados obtidos e utilizando o software *Statistica 6.0*, foi construído um gráfico de superfície de resposta, do qual foram determinadas as condições ótimas para extração da nicotina da solução aquosa.

4.3.2. Otimização das condições de extração da nicotina do cigarro

Utilizando a massa de um cigarro (700 mg), otimizou-se o volume da solução extratora de Na_2CO_3 (pH 11,0) na faixa de 30 - 100 mL, em intervalos de 10 mL. A alíquota do extrato tomada para análise foi proporcional ao volume de solução extratora, sendo coletadas alíquotas de 100 a 300 μL , respectivamente para 30 e 100 mL de solução extratora. Construiu-se um gráfico de área de pico por volume da solução extratora, para observar o comportamento da quantidade de nicotina extraída do fumo com o aumento do volume da solução.

Para comprovar o estudo da diluição, foram pesados 700 e 100 mg do fumo respectivamente, em balão de 100 mL e completado com a solução extratora. Após agitação magnética por 20 min, a fase sólida foi separada da líquida através de filtração e uma alíquota de 300 μ L do extrato filtrado foi coletada e adicionada ao frasco de SPME, sendo analisada sob as condições de extração otimizadas. A fase sólida anteriormente separada foi novamente extraída seguindo o mesmo procedimento por mais duas vezes.

4.3.3. Validação do método

A validação do método foi realizada pela avaliação dos seguintes parâmetros analíticos: faixa linear, coeficiente de correlação (R), limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), precisão e exatidão.

A construção da curva de calibração externa foi realizada pela diluição da solução padrão aquosa de nicotina 200 mg L⁻¹ na faixa de 0,1 a 0,6 mg L⁻¹.

Para construção da curva de calibração por adição de padrão, pesou-se a massa de um cigarro (700 mg) em balões de 100 mL, sendo o volume completado com a solução extratora e com concentrações crescentes do padrão de nicotina. Após agitação magnética por 20 min, coletou-se uma alíquota de 100 μ L do extrato e adicionou-se ao frasco de SPME, onde se realizou a extração sob condições otimizadas.

4.3.4. Aplicação do método

O procedimento utilizado para aplicação do método foi realizado para amostras de cigarro comercial e ilegalmente comercializado. Quatro diferentes marcas de cigarros de ambas as amostras foram analisadas. Para cada marca, foi retirado o fumo de cinco cigarros, homogeneizados e pesado a massa equivalente a um cigarro, aproximadamente 700 mg. Foram adicionados 100 mL da solução extratora ao fumo e posterior agitação magnética. Uma alíquota de 100 μ L foi coletada e adicionada ao frasco de SPME contendo 10 mL da solução saturada. Após extração por 25 min. na temperatura de 50 °C com o dispositivo contendo a fibra PDMS 100 μ m, a análise foi realizada. Todas as amostras de cigarros foram analisadas pelo menos em duplicata.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A escolha da fibra foi baseada no trabalho realizado por Yashiki e colaboradores^[32], onde foi utilizada a fibra PDMS 100 µm, para extração da nicotina por amostragem a partir do *headspace* e análise em GC – MS.

O revestimento de polidimetilsiloxano (PDMS) é do tipo polímero líquido, todavia, visualmente parece ser um sólido devido a sua alta viscosidade^[33]. Esta característica a torna vantajosa, pois garante uma adequada dessorção dos analitos no momento da injeção. Outra vantagem desta fibra é a capacidade de suportar altas temperaturas, (até 340 °C, dependendo da espessura do filme), quando na dessorção para injeção dos analitos em GC.^[28, 34]

PDMS tem características de uma fase não polar sendo aplicado com sucesso na extração e determinação de analitos não polares. Todavia, pode ser utilizado adequadamente para muitos compostos polares, particularmente após a otimização das condições de extração.^[28]

5.1. Otimização das condições de extração da nicotina por HS-SPME

As variáveis tempo de agitação e temperatura foram estudadas para avaliar a melhor condição de extração da nicotina no fumo do cigarro. Como apenas dois fatores foram estudados, a otimização foi realizada através de um planejamento composto central envolvendo 10 experimentos, com duplicata no ponto central. A Tabela 3 mostra as respostas analíticas obtidas para o cigarro comercial e ilegalmente comercializado.

Tabela 3. Respostas obtidas para o planejamento composto central.

Experimento	Temperatura (°C)	Tempo (min.)	Área 1 ^a	Área 2 ^b
1	25	16	663966	2345683
2	35	8	1074173	7700972
3	35	24	3258546	8155608
4	45	0	0	0
5	45	32	72010912	12787167
6	45	16	5020402	9226226
7	45	16	9587736	13365438
8	55	8	4606848	9486505
9	55	24	6130898	7535086
10	65	16	6421485	7774981

^a Cigarro legalmente comercializado; ^b Cigarro ilegalmente comercializado.

Com os resultados obtidos, a metodologia de superfície de resposta foi utilizada para determinar a melhor condição de extração. A Figura 7 mostra as superfícies obtidas para ambas as amostras de cigarro.

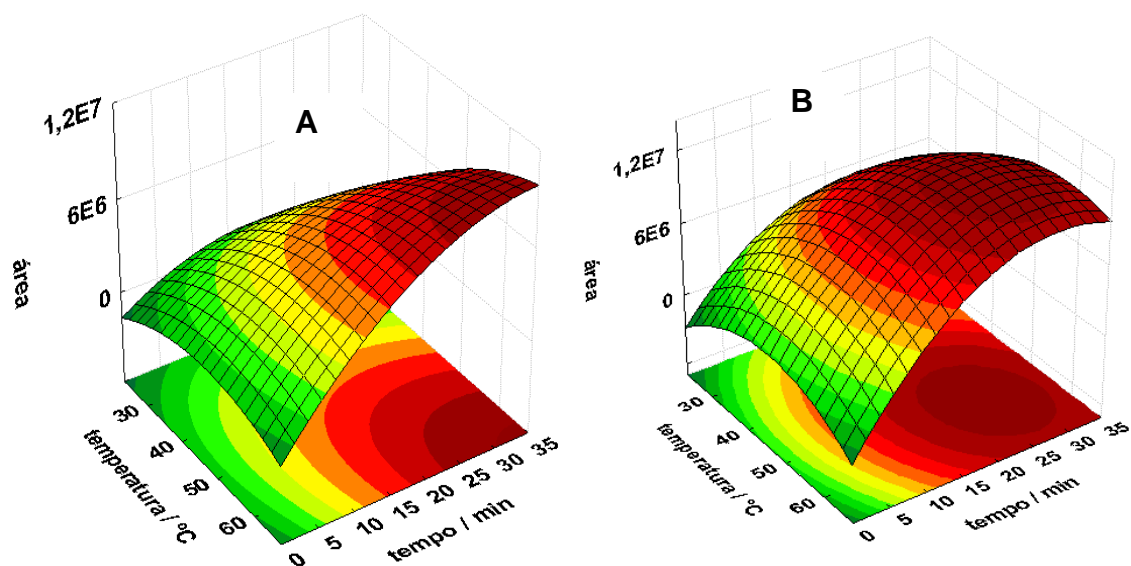


Figura 7. Superfície de resposta para otimização da extração da nicotina.
Legenda: A - Cigarro comercial; B – Cigarro ilegalmente comercializado.

De acordo com a Figura 6, observou-se para ambos os cigarros que a melhor resposta analítica deu-se em temperatura por volta de 50 °C e tempo de extração de 25 min, sendo esta a condição de extração da nicotina empregada em todas as etapas deste trabalho. A temperatura exerce um efeito contrário em SPME. O aumento da quantidade extraída com o aumento da temperatura é devido ao aumento da pressão de vapor dos analitos, e, conseqüentemente, ao aumento da concentração desses no *headspace* da amostra. Já a queda na quantidade extraída após certa temperatura é devida à natureza exotérmica do processo de absorção dos analitos pelo recobrimento da fibra. Em outras palavras, a partir de uma determinada temperatura o aumento da concentração dos analitos no headspace da amostra não é capaz de superar a queda da afinidade do recobrimento da fibra pelos analitos, e o sinal analítico cai.

O tempo de extração é outra variável extremamente importante em SPME, visto que o processo de transferência dos analitos da amostra em direção ao recobrimento é dependente do tempo, sendo geralmente representado por uma cinética de primeira ordem, ou seja, a velocidade de extração dos analitos pela fibra é proporcional à diferença de concentração dos analitos no recobrimento da fibra e na amostra. A partir do momento em que o sinal analítico não mudar mais com o aumento do tempo de extração, o equilíbrio é atingido. Neste trabalho, o equilíbrio é atingido em aproximadamente 25 min para ambas as amostras.

5.2. Otimização das condições de extração da nicotina do cigarro

Este estudo foi realizado para verificar a influência da solução extratora de Na₂CO₃ (pH 11,0) na quantidade de nicotina extraída da matriz sólida. A Figura 8 mostra o gráfico relacionando área e o volume de solução de Na₂CO₃.

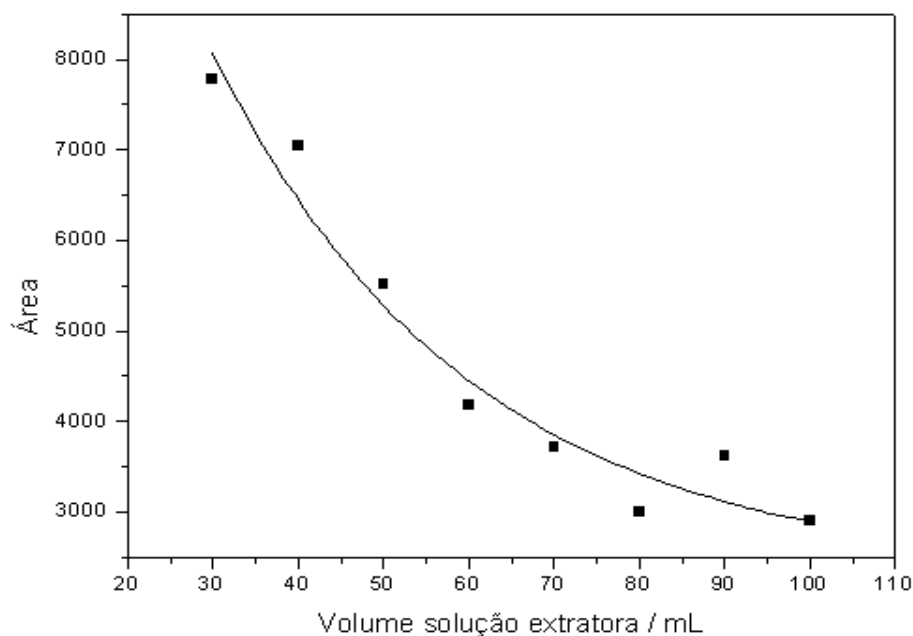


Figura 8. Efeito do aumento do volume da fase extratora sobre a quantidade de nicotina extraída.

De acordo com o gráfico, observou-se que o aumento do volume não influencia na quantidade de nicotina extraída da matriz sólida, ocorrendo apenas a diluição do extrato. Deste modo, qualquer volume no intervalo de 30 a 100 mL pode ser utilizado para extrair toda a nicotina de 700 mg de amostra. Este resultado foi confirmado através da realização de três extrações da mesma amostra utilizando um volume de 100 mL da solução extratora com massas de fumo de 700 e 100 mg. Os resultados obtidos são visualizados pela Figura 9.

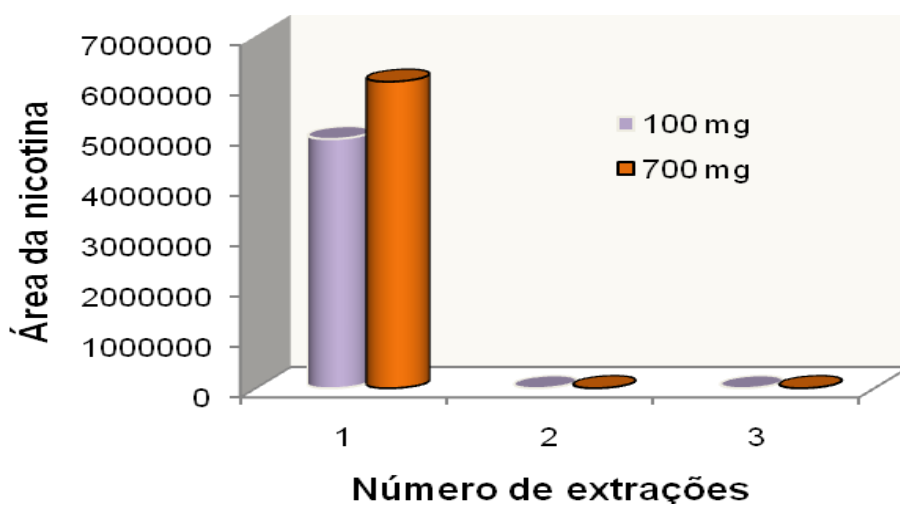


Figura 9. Comprovação da extração nicotina.

Com a realização de três experimentos, observou-se que somente na primeira extração a nicotina foi detectada, tanto para massa de 700 mg como para 100 mg de fumo do cigarro, sendo, portanto esse resultado concordante com o estudo demonstrado anteriormente, no qual a variação do volume de solução extratora não influenciou na quantidade extraída de nicotina da matriz sólida. Como condição ótima para obtenção do extrato foi então fixada massa de nicotina de 700 mg e volume de solução extratora de 100 mL.

5.3. Validação do método

A Tabela 4 mostra as figuras de mérito do método proposto para determinação de nicotina em fumo de cigarro.

Tabela 4. Figuras de mérito do método para determinação de nicotina.

Faixa linear ^c	Equação da reta	R ²	LOD ^c	LOQ ^c
0,1 – 0,6	$y = 2,01 \times 10^7 x - 1,05 \times 10^5$	0,995	0,05	0,15

^c (mg L⁻¹).

O método mostrou-se linear dentro da faixa de aplicação de 0,1 – 0,6 mg L⁻¹, observada pelo valor de coeficiente de correlação (R²) superior a 0,995. Os limites de detecção e quantificação foram calculados a partir da equação da curva de regressão sendo respectivamente, 3 e 10 vezes o desvio padrão do intercepto pelo coeficiente angular da curva. Para a nicotina o valor de LOD foi de 0,05 mg L⁻¹ e de LOQ 0,15 mg L⁻¹.

5.3.1. Avaliação da exatidão do método

O estudo da recuperação para determinação da exatidão do método foi realizado pela comparação entre as inclinações da curva de calibração em água e da curva por adição de padrão. A relação entre as sensibilidades das curvas multiplicada por 100 fornece a exatidão do método quando utilizado a curva de calibração em água para quantificação da nicotina no cigarro. Nesse trabalho, obteve-se uma exatidão de 87%, demonstrando que o método sofre pouca influência dos componentes da matriz, provavelmente devido à etapa prévia de separação da

nicotina da matriz sólida. Assim, pode-se proceder à quantificação das amostras pelo uso da curva de calibração em água, simplificando o procedimento, pois não é necessário construir uma curva de calibração para cada amostra que se pretende analisar.

5.4. Aplicação do método proposto

Foram analisadas quatro amostras de cigarro comerciais (A, B C e D) e quatro de cigarro ilegalmente comercializados (E, F, G e H). As amostras foram analisadas em duplicata de injeção. Os resultados são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5. Determinação de nicotina em amostras de cigarro.

Amostra	Nicotina (mg g ⁻¹)	RSD (%) ^f
A ^d	7,42 ± 0,04	0,54
B ^d	6,91 ± 0,55	7,96
C ^d	7,57 ± 0,10	1,32
D ^d	5,18 ± 0,21	4,07
E ^e	11,04 ± 0,08	0,76
F ^e	11,07 ± 0,01	0,01
G ^e	11,07 ± 0,06	0,51
H ^e	13,74 ± 0,74	5,42

^d Legalmente comercializado; ^e Ilegalmente comercializado; ^f n = 2.

Os resultados das quantificações podem ser observados na Figura 10, onde foi construído um gráfico de barras correlacionando a concentração de nicotina no fumo do cigarro para as amostras.

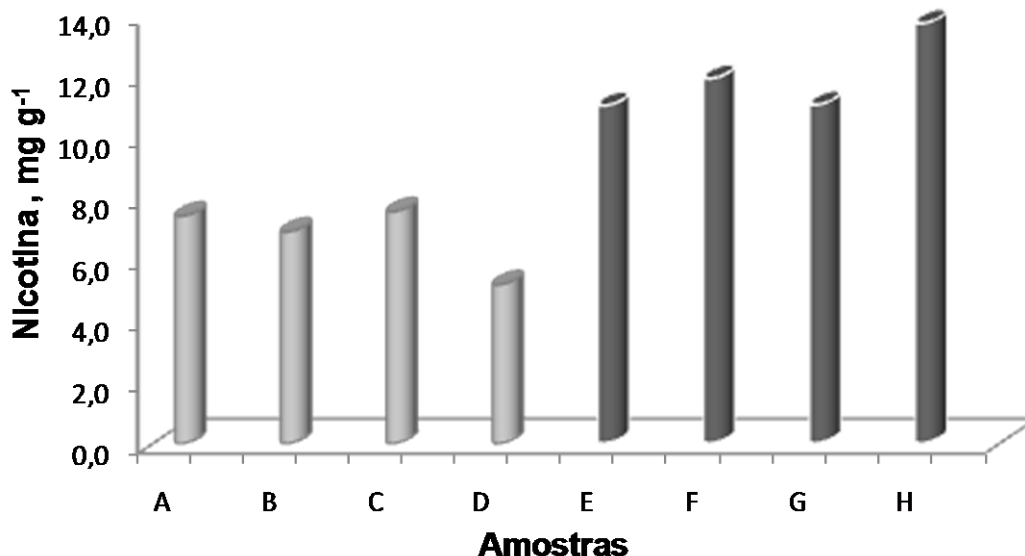


Figura 10. Comparação da quantidade de nicotina encontrada em amostras de cigarro.
 Legenda: (A, B, C e D) – comercializadas legalmente; (E, F, G e H) – comercializadas ilegalmente.

As marcas A, B, C, D são cigarros comercialmente legalizados e as marcas E, F, G, H são cigarros ilegalmente comercializados. De acordo com os valores encontrados, observa-se que todas as marcas de cigarros ilegalmente comercializados possuem valores mais elevados do teor de nicotina em relação aos cigarros comerciais. Relatórios expedidos por instituições de controle do tabaco citam que os cigarros ilegais possuem um elevado teor de nicotina. ^[36]

O processo de fabricação pode ser um fator a ser considerado para os valores mais elevados nestes cigarros. Nas indústrias comerciais, o fumo passa por um período de cura, onde o este é colocado em uma estufa por um período de tempo. Neste processo parte da nicotina perde-se por volatilização, tendo sua concentração diminuída no fumo. ^[7]

Uma vez que os cigarros comercializados ilegalmente são produzidos em indústrias que não passam por nenhum tipo de controle, uma hipótese para estes cigarros possuírem maiores teores de nicotina pode estar relacionada com o processo de secagem do fumo. Estes cigarros podem ser ter sido feitos com folhas que ainda não estão bem secas ou que talvez nem tenham passado pelo processo de cura, implicando em concentrações mais altas de nicotina no produto final.

A comparação dos dados obtidos entre as amostras de cigarros comerciais foi realizada. A e B pertencentes a uma indústria e B e C pertencentes à outra indústria.

De acordo com o fabricante de A e B, a mesma mistura de fumo contida em ambos é utilizada. ^[7] Partindo desta informação, espera-se que o teor de nicotina entre eles possua valores muito próximos, o que pôde ser comprovado através da observação do gráfico da Figura 10 e dos valores encontrados, $7,42 \pm 0,04 \text{ mg g}^{-1}$ para marca A e $6,91 \pm 0,55 \text{ mg g}^{-1}$ para marca B.

Pelos valores de C ($7,57 \pm 0,10 \text{ mg g}^{-1}$) e D ($5,18 \pm 0,21 \text{ mg g}^{-1}$), observa-se uma significativa diferença entre os teores de nicotina encontrados. O fabricante não informa se a mistura de fumo utilizada é a mesma para ambas. Como existem vários tipos de fumos e a concentração de nicotina é mais elevada dependendo do tipo ^[37] uma hipótese para esta diferença entre os teores pode estar relacionada à utilização de fumos diferenciados entre as duas marcas.

6. CONCLUSÃO

A otimização das condições de extração da nicotina no fumo do cigarro, utilizando o planejamento composto central, mostrou-se eficiente para cigarros comerciais e ilegalmente comercializados.

A validação do método proposto apresentou um coeficiente de correlação linear adequado dentro da faixa de concentração estudada. Os limites de detecção e quantificação apresentaram valores baixos aplicáveis à quantificação das amostras.

Pela construção da curva de calibração por adição de padrão, observou-se que a matriz do fumo não interfere na extração e quantificação de nicotina das amostras. Os valores obtidos para a recuperação da nicotina nas amostras demonstram a boa exatidão do método.

Associados a um procedimento simples de preparo e análise, o método proposto utilizando o sistema SPME – GC – MS foi aplicado com sucesso para quantificação de nicotina em amostras de cigarro comercial e ilegalmente comercializado.

De acordo com os resultados de quantificação das amostras podemos perceber nítida diferença nos teores de nicotina no fumo para cigarros comerciais e ilegalmente comercializados. Este método pode ser utilizado por indústrias tabaqueiras legalizadas como alternativa ao controle de qualidade deste produto.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. CUNHA, G. H.; JORGE, A. R.C.; FONTELES, M. M. F.; SOUSA, F. C. F.; VIANA, G. S. B.; VASCONCELOS, S. M. M. *Nicotina e Tabagismo*. Revista eletrônica pesquisa médica. N. 4. V. 1. 2007. p. 1- 10.
2. ROSEMBERG, J. *Nicotina: Droga Universal*. São Paulo: SES/CVE, 2003. 174 p.
3. GORROD, J. W.; JACOB III, P. *Analytical determination of nicotine and related compounds and their metabolites*. Elsevier Science, 1999. 772 p.
4. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo-CETESB. Disponível em: < http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/produtos/ficha_completa1.asp?consulta=NICOTINA >. Acesso em: 01 nov. 2009.
5. SANTOS, F. J. A. G.; NOGUEIRA, J. P. F. N., NEVES, M. L. *Nicotina- Monografia*. Disponível em: <<http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0607/nicotina/Biotox.html> >. Acesso em: 02 mai. 2009.
6. Centro de Informações Toxicológicas Rio Grande do Sul. Disponível em: < <http://www.cit.rs.gov.br/> >. Acesso em: 01 nov. 2009.
7. Souza Cruz. Disponível em: < <http://www.souzacruz.com.br/> >. Acesso em: 01 nov. 2009.
8. U. S. Department of Health & Human Services. Disponível em: < <http://www.hhs.gov/asl/testify/2007/11/t20071113b.html> >. Acesso em: 12 out. 2009.
9. British American Tobacco. Disponível em: < http://www.bat.com/group/sites/uk__3mnfen.nsf/vwPagesWebLive/DO6TNKVW?openDocument&SKN=1 >. Acesso em: 15 out 2009.
10. DASH, A. K.; WONG, S. T. *Liquid chromatographic method for the determination of nicotine in pharmaceutical formulations*. J. Chromatogr. A. 749, 1996. p. 81.
11. DOMINO, E. F; HARIHARAN, M.; VANNOORD, T.; DEMANA, T. *Current experience with HPLC and GC-MS analyses of nicotine and cotinine*. Med Sci Res 20, 1992. p. 859.
12. AL-TAMRAH, S.A. *Spectrophotometric determination of nicotine*. Anal Chim Acta 379,1999. p.75.
13. LIU, J-F.; FENG, Y-D. *Determination of nicotine by reagent injection flow injection photometric method*. Talanta 47, 1998. p.833.

14. MARSH A.; CLARK B. J.; ALTRIA, K. D. *Orthogonal separations of nicotine and nicotine-related alkaloids by various capillary electrophoretic modes*. Electrophoresis 25, 2004. p.1270
15. BAIDOO, E. E. K.; CLENCH, M. R.; SMITH, R. F.; TETLER, L. W. *Determination of nicotine and its metabolites in urine by solid-phase extraction and sample stacking capillary electrophoresis-mass spectrometry*. Journal of Chromatography B, 796 (2003) 303–313.
16. CAI, J.; LIU, B.; LIN, P.; SU, Q. *Fast analysis of nicotine related alkaloids in tobacco and cigarette smoke by megabore capillary gas chromatography*. J. Chromatogr. A 1017, 2003. p.187.
17. BECKETT A. H.; TRIGGS, E. J. *Determination of nicotine and its metabolite, cotinine, in urine by gas chromatography*. Nature. 211, 1966. p.1415.
18. SHENG, L.Q.; DING, L.; TONG, H.W.; YONG, G.P.; ZHOU, X.Z.; LIU, S.M. *Determination of Nicotine-Related Alkaloids in Tobacco and Cigarette Smoke by GC-FID*. Chromatographia. 62, 2005. p. 63 – 68.
19. BRAITHWAITE, A.; SMITH, F. J. *Chromatographic methods*. Kluwer Academic Publishers. ed. 5, 1999, 545 p.
20. SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; STANLEY, R. C. *Fundamentos de Química Analítica*. Thomson. ed. 8. 2007. p. 999.
21. ALMEIDA, C.; ROSÁRIO, P.; SERÔDIO, P.; NOGUEIRA, J. M. F. *Novas Perspectivas na Preparação de Análises Cromatográficas*. Química. v. 4. 1995. p. 69- 77.
22. BUDZIAK, D.; MARTENDAL, E.; CARASEK, E. *Application of NiTi alloy coated with ZrO₂ as a new Fiber for solid-phase microextraction for determination of halophenols in water sample*. Analytica Chimica Acta, 598 (2), 254-260, 2007
23. EISERT, R., PAWLISZYN, J.; *Design of automated solid-phase microextraction for trace analysis of organic compounds in aqueous samples*, Journal of Chromatography A, 776, 293-303, (1996).
24. CHIAROTTI, M.; MARSILI, R.; MOREDA-PIÑEIRO, A.; *Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of residual solvent trapped into illicit cocaine exhibits using head-space solid-phase microextraction*, Journal of Chromatography B, 772, 249-256, (2002).
25. MILLÁN S.; SAMPEDRO M. C.; et al; *Coupling solid-phase microextraction and high-performance liquid chromatography for direct and sensitive determination of halogenated fungicides in wine* ; Journal of Chromatography A, 995, 135-142, (2003).
26. OLESIK, J.W.; KINZER, J.A.; GRUNWALD, E.J.; et al; *The potential and challenges of elemental speciation by capillary electrophoresis inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray or ion spray mass spectrometry*, Spectrochimica Acta Part B, 53, 239-251, (1998).

- 27.** VALENTE, A. L. P. V.; AUGUSTO, F. *Microextração por Fase Sólida*. Química Nova. v. 23.n.4.2000 p. 523-530
- 28.** PAWLISZYN, J. *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*. New York: Wiley-VHC, Inc, 1997, 247 p.
- 29.** ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. *Solid-phase microextraction with thermal desorption using fused-silica optical fibers*. Analytical Chemistry, v. 62, p. 2145, 1990.
- 30.** NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. *Planejamento e otimização de experimentos*. 2. ed. Campinas: Editora UNICAMP, 299p., 1996.
- 31.** TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. *Quimometria II: Planilhas Eletrônicas para Cálculos de Planejamentos*. Química Nova. Vol. 29, No. 2, 338-350, 2006.
- 32.** YASHIKI, M.; NAGASAWA, N.; KOJIMA, T.; MIYAZAKI, T. Y. J. Forensic Toxicol. 13 (1) (1995) 17.
- 33.** GÓRECKI, T. *Application of solid phase microextraction*. Chapter 7: *Solid versus Liquid Coating*. Royal Society of Chemistry, 1999. p. 92 – 108.
- 34.** MANI, V. *Application of solid phase microextraction*. Chapter 5: *Properties of Commercial SPME Coatings*. Royal Society of Chemistry, 1999. p. 57 – 91.
- 35.** RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO L. F. C. *Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos*. Quim. Nova, v. 27, n. 5, p. 771 – 780, 2004.
- 36.** Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: < http://www.fiomaravilha.com.br/Fio%20Maravilha/assinaturas/resposta_Anvisa.htm > Acesso em: 1 nov 2009
- 37.** Philip Morris International. Disponível em: < http://www.philipmorrisinternational.com/br/pages/por_br/ >. Acesso em: 1 nov 2009